

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

**产品货号: E-BC-K091-S**

**产品规格: 50 assays(48 samples)/ 100 assays(96 samples)**

**检测仪器: 紫外-可见光分光光度计 (520 nm)**

## **Elabscience®碱性磷酸酶(ALP)比色法测试盒**

### **Alkaline Phosphatase (ALP) Activity Assay Kit**

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：[biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址：[www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

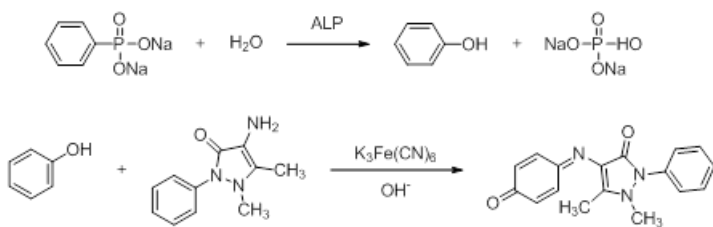
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测动物血清(浆)、体液、组织及细胞中碱性磷酸酶的活力。

## 检测原理

在 pH=10 的反应液中，碱性磷酸酶催化磷酸苯二钠水解，生成游离酚和磷酸。酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉结合，并经铁氰化钾氧化生成红色的醌的衍生物，根据红色的深浅计算酶活的高低。



本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (50 assays)	规格 2 (Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	基质液 (Substrate Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	60 mL×2 瓶	60 mL×3 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	0.5 mg/mL 酚标准储备液 (0.5 mg/mL Phenol Standard)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×1 支	2-8℃ 避光 保存 6 个月

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**紫外-可见分光光度计（520 nm）、涡旋混匀仪、37℃恒温箱、微量移液器（1000 μL，200 μL，100 μL，10 μL）。

**耗材：**枪头（1000 μL，200 μL，10 μL）、EP管（5 mL，2 mL）、吸水纸、擦镜纸。

**试剂：**双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

## 试剂准备

① 试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 0.1 mg/mL 酚标准应用液：

按试剂四：双蒸水为1:4的体积比稀释，现配现用。

## 样本准备

### ① 样本处理

血清血浆等液体样本：直接测定。

组织样本：组织处理的匀浆介质为生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS(0.01 M, pH 7.4)。匀浆后，4℃，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取约 10<sup>6</sup> 个细胞加入 300-500 μL 生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS (0.01 M, pH 7.4) 匀浆。匀浆后，4℃，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，结合本试剂盒的检测范围(0.2-55.6金式单位/100 mL)，选取最佳稀释倍数，进行正式批量实验。不同样本的稀释比例范围如下表（仅供参考）：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%小鼠肾匀浆	30-50
人尿液	不稀释	10%小鼠肝匀浆	不稀释
大鼠血清	不稀释	HepG2 细胞	不稀释
细胞上清	不稀释	10%小鼠脑匀浆	不稀释

注：稀释液为 PBS (0.01 M, pH 7.4) 或生理盐水 (0.9% NaCl)。

## 实验关键点

操作时，加完试剂二置 37℃ 孵育 15 min，迅速加入试剂三，避免长时间放置后加样导致结果不准确。

## 操作步骤

- ① 空白管：取 50  $\mu\text{L}$  双蒸水加入到 5 mL EP 管中；  
标准管：取 50  $\mu\text{L}$  0.1 mg/mL 酚标准应用液加入到 5 mL EP 管中；  
测定管：取 50  $\mu\text{L}$  样本加入到 5 mL EP 管中。
- ② 向步骤①各管中，分别依次加入 500  $\mu\text{L}$  试剂一、500  $\mu\text{L}$  试剂二，涡旋混匀。
- ③ 置 37°C 孵育 15 min，迅速加入 1500  $\mu\text{L}$  试剂三，并立即涡旋混匀。
- ④ 紫外-可见分光光度计，520 nm 波长，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定各管吸光度。

## 操作表

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 ( $\mu\text{L}$ )	50	--	--
0.1 mg/mL 酚标准应用液 ( $\mu\text{L}$ )	--	50	--
样本 ( $\mu\text{L}$ )	--	--	50
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500
充分混匀，置 37°C 孵育 15 min			
试剂三 ( $\mu\text{L}$ )	1500	1500	1500
混匀，520 nm，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测其吸光度。			

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

## 结果计算

### 血清（浆）等液体样本中 ALP 活力计算：

定义：100 mL 血清在 37°C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金式单位。

$$\text{ALP 活力} \quad (\text{金式单位}/100 \text{ mL}) = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times m \times \frac{V_1}{V} \times f$$

### 组织、细胞中 ALP 活力计算：

定义：每克组织或细胞蛋白在 37°C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金式单位。

$$\text{ALP 活力} \quad (\text{金式单位}/\text{gprot}) = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times m \div (C_{\text{pr}} \times V) \times f$$

### 注解：

$\Delta A_1$ ：样本 OD 值-空白 OD 值

$\Delta A_2$ ：标准 OD 值-空白 OD 值

m：标准管含酚量（0.005 mg）

V：加入样本的体积（0.05 mL）

$V_1$ ：单位定义中血清体积（100 mL）

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

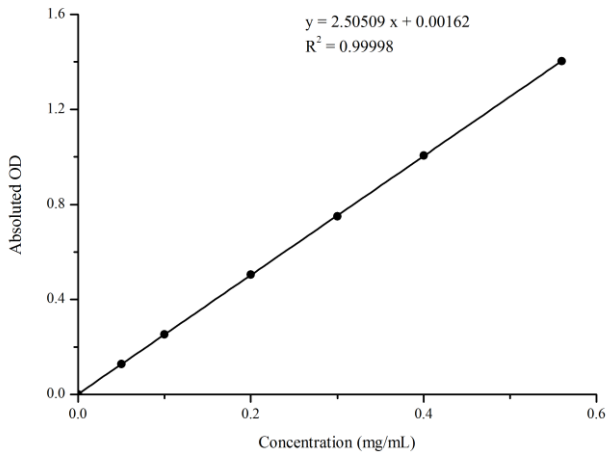
$C_{\text{pr}}$ ：待测样本的蛋白浓度（g/mL）

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

检测范围	0.2-55.6 金式单位/100 mL	平均批间差	5.6 %
灵敏度	0.2 金式单位/100 mL	平均批内差	2.1 %
平均回收率	99 %		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)



## 附录2 实例分析

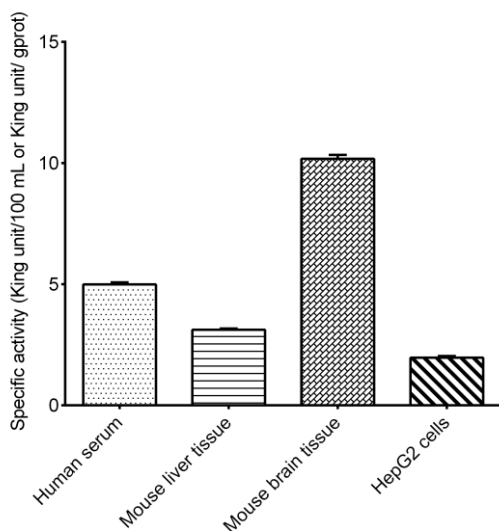
例如检测大鼠血清(数据仅供参考):

取50  $\mu\text{L}$ 大鼠血清,按说明书中操作表操作,结果如下:

空白管OD值为0.020,测定管OD值为0.345,标准管OD值为0.270,带入公式计算得:

$$\text{ALP 活力 (金氏单位/100 mL)} = \frac{0.345-0.020}{0.270-0.020} \times 0.005 \times \frac{100}{0.05} = 13.01 \text{ 金氏单位/100 mL}$$

按照说明书操作,测定人血清(加样量50  $\mu\text{L}$ )、小鼠肝脏组织(10%组织匀浆的蛋白含量0.013 g/mL,加样量50  $\mu\text{L}$ )、小鼠脑组织(10%组织匀浆的蛋白含量0.004 g/mL,加样量50  $\mu\text{L}$ )及HepG2细胞(蛋白含量0.003 g/mL,加样量50  $\mu\text{L}$ )中碱性磷酸酶的活力(如下图):





### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	37°C 孵育后没有迅速加入试剂三	37°C 孵育后应迅速加入试剂三
	加试剂三后没有充分混匀	加完试剂三，充分混匀
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	升高样本检测液制备过程中的组织浓度，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果 >55.6 金式单位/100 mL	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

#### 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

## 附录4 客户发表文献

1. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Xia H, Scholtes C, Dufour CR, et al. Insulin action and resistance are dependent on a GSK3 $\beta$ -FBXW7-ERR $\alpha$  transcriptional axis. *Nat Commun*. 2022; 13 (1):2105. IF:14.919
3. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene-Drug Combination Cancer Therapy[J]. *Small*, 2021, 2006223. IF:11.459
4. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> self-sufficiency[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 122. IF:8.203
5. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf $\beta$ signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(17). IF:6.665
6. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021:2001133. IF:5.914
7. Wang C, Ma C, Fu K, et al. Phillygenin Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis via Modulating Inflammation and Gut Microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 9, 21. IF:5.81
8. Du Y Q, Zheng Y Z, Yu C X M, et al. The Mechanisms of Yu Ping Feng San in Tracking the Cisplatin-Resistance by Regulating ATP-Binding Cassette Transporter and Glutathione S-Transferase in Lung Cancer Cells[J].*Frontiers in Pharmacology*, 2021; 12: 678126. IF:5.81
9. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 147, 104357. IF:5.574
10. Cao X, Liang Y, Liu R, et al. Uncovering the Pharmacological Mechanisms of Gexia-Zhuyu Formula (GXZY) in Treating Liver Cirrhosis by an Integrative Pharmacology Strategy. *Front Pharmacol*. 2022; 13:793888. IF:5.331

11. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. *Int J Mol Med.* 2022; 50 (1). IF:5.314
12. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1 -Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020. IF:5.309
13. Ali A K, Komal A K, Almutairi S M, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 2688. IF:5.085
14. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2021 Jul;136:106003. IF:5.085
15. Naseh A, Shirin B, Maryam M, et al. Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. *Life Sciences* 266 (2021) 118876. IF:5.037
16. Ahmed A E, Alshehri A, Al-Kahtani M A, et al. Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109841. IF:4.545
17. Su S, Tian H, Jia X, et al. Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
18. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
19. Dejan Lazić, Andreas Scheurer, Dušan Čočić, et al. New bis-pyrazolopyridine ruthenium(III) complex as a potential anticancer drug: In vitro and in vivo activity in murine colon cancer[J]. *Dalton Transactions*, 2021 Jun; 50(22):7686-7704. IF:4.39
20. Li X, Lv Z, Chen J, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 151:112124. IF:4.06
21. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al.

- Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
22. Zhang S, Jiang L, Hu H, et al. Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF- $\alpha$  ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage[J]. *Life Sciences*, 2020, 246: 117401. IF:3.647
  23. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
  24. Sohini Sen, Shaunak Ghosh, Sayantan De, et al. Immunomodulatory and antimicrobial non-mulberry *Antheraea mylitta* silk fibroin accelerates in vitro fibroblast repair and regeneration by protecting oxidative stress[J]. *RSC Advances*, 2021 May; 11(31):19265-19282. IF:3.361
  25. Li Jianda, Yuan Chen, Liu Peng et al. Red blood cells serve as a vehicle for PEDV transmission.[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 257: 109081. IF:3.293
  26. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf $\beta$  signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020. IF:3.057
  27. Cui Y, Wang Y, Liu G. Protective Effect of Barbaloin in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through the Regulation of the CNPY2?PERK Pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019. IF:2.928
  28. Sun Yan-Chun, Han Shi-Cheng, Yao Ming-Zhu, et al. High-throughput metabolomics method based on liquid chromatography-mass spectrometry: Insights into the underlying mechanisms of salinity-alkalinity exposure-induced metabolites changes in *Barbus capito*[J]. *Journal of Separation Science*, 2021 Jan; 44(2):497-512. IF:2.878
  29. Mustafa H N, Hegazy G A, El Awdan S A, et al. Liver ischemia/reperfusion injury, a setting in which the functional mass is reduced and the role of PDE5 inhibitor[J]. *Eur. J. Anat*, 2019, 23(5): 325-332. IF:2.638
  30. Chen L, Ma K, Fan H, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis.[J]. *Spandidos Publications*, 2021(2). IF:2.447